

PO/EP

98 / 04036

09/445796

REC'D 14 OCT 1998  
WIPO PCT



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

97111380.8

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

  
M.B. RIJLING

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,  
LA HAYE, LE

17/09/98



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: **97111380.8**  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: **05/07/97**  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
**SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.**  
**1800 Vevey**  
**SWITZERLAND**

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
**Absorption des minéraux par les cellules intestinales**

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:	Tag:	Aktenzeichen:
State:	Date:	File no.
Pays:	Date:	Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

**A61K35/74, A23C9/123, A23L1/03**

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:  
**Le titre initial de l'invention est: "Absorption des minéraux"**

## Absorption des minéraux

La présente invention a trait à l'influence des bactéries lactiques sur l'absorption des minéraux par les mammifères.

5

### Etat de la technique

Les minéraux sont des éléments clés des processus physiologiques majeurs. Le calcium est, par exemple, d'une importance vitale pour la formation des os et des dents, la contraction musculaire, la synthèse d'hormones. Le calcium est également un messager secondaire primordial de la plupart des phénomènes d'activation cellulaire.

15 Les minéraux, uniquement apportés par l'alimentation, sont assimilés par l'organisme en traversant la muqueuse intestinale pour ensuite passer dans la circulation sanguine. Le degré d'assimilation (ou d'absorption) des minéraux par l'organisme dépend en fait à la fois de leur solubilité dans le milieu intestinal et de la capacité des cellules intestinales à les assimiler et les transférer dans la circulation sanguine (R. Wasserman et al., *In Mineral Absorption in the 20 Monogastric GI Trac*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 249, 45-65, Plenum Press, N.Y., 1989).

25 La localisation, l'efficacité et les mécanismes d'absorption du calcium tout le long de l'intestin ont été étudiés chez le rat et le poulet depuis de nombreuses années (Bronner F., J. Nutr., 122, 641-643, 1992; Schacter D., Am. J. Physiol., 196, 357-362, 1959). Pour des raisons éthiques et techniques évidentes, de telles études ont été limitées chez l'homme (Hylander E. et al., Scand. J. Gastroenterol., 25, 705, 1990) et seules quelques études *in-vitro* ont été entreprises (Elsherydah A. et al., Gastroenterology, 109, 876, 1995; Feher J.J., Am. J. Physiol., 244, C303, 1983; 30 Feher J.J., Cell Calcium, 10, 189, 1989).

35 L'un des aspects les plus étudiés de l'absorption des minéraux est la biodisponibilité des minéraux selon la composition de la diète journalière (Bronner F., J. Nutr., 123, 797, 1993). Néanmoins, à ce jour, aucune étude n'a été entreprise concernant l'influence directe des bactéries lactiques sur l'absorption des minéraux par les cellules intestinales.

On peut cependant citer l'article de Kot et al. qui fait observer que les *Lactobacillus acidophilus* internalisent naturellement  $Fe^{2+}$ , et l'oxydent en  $Fe^{3+}$  qui est une forme insoluble plus difficilement assimilable par d'autres microorganismes (J. Agric Food Chem, 43, 1276-1282, 1995).

#### Résumé de l'invention

Grâce à un nouveau modèle *in-vitro*, on a pu mettre en évidence la capacité de certaines souches de bactéries lactiques à directement faciliter l'absorption des minéraux, notamment du calcium, par les cellules intestinales humaines. Ce phénomène pourrait être lié au fait que le contact des cellules intestinales avec les bactéries lactiques induit une acidification du micro-environnement qui ne serait pas le fait des bactéries lactiques uniquement mais auquel participeraient les cellules intestinales. Cette acidification localisée pourrait ainsi jouer un rôle actif dans la solubilisation des minéraux, et donc dans la capacité de l'organisme à les assimiler.

Sur la base de ces observations, la présente invention a ainsi trait à l'utilisation des bactéries lactiques pour la préparation d'une composition destinée à être administrée oralement à un mammifère de sorte à faciliter l'absorption par les cellules intestinales des minéraux présents dans une diète journalière.

#### Description détaillée de l'invention

L'administration orale d'une composition renfermant des bactéries lactiques est destinée à faciliter l'absorption des minéraux présents dans une diète journalière, c'est à dire tous les composés susceptibles d'être solubilisés dans l'intestin renfermant du calcium, du magnésium, du fer et/ou du zinc, par exemple.

L'ingestion de bactéries lactiques permettrait en fait d'augmenter la biodisponibilité des minéraux, c'est à dire de rendre les minéraux naturellement peu solubles dans l'intestin plus accessibles aux cellules intestinales.

Dans le cadre de la présente invention, toutes les souches de bactéries lactiques peuvent être utilisées, et en particulier les bactéries lactiques choisies parmi les espèces *Lactococcus lactis* notamment *L. lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp.

*lactic* biovar *diacetylactis*; *Streptococcus thermophilus*; le groupes des bactéries acidophiles constitué de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus johnsonii*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus fermentum*; 5 *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus casei* notamment *L. casei* subsp. *casei* et *L. casei* subsp. *rhamnosus*; *Lactobacillus delbruckii* notamment *L. delbruckii* subsp *lactis*, *L. delbruckii* subsp. *helveticus* et *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus*; les 10 bifidobactéries notamment *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*; et enfin *Leuconostoc mesenteroides* notamment *L. mesenteroides* subsp *cremoris*, par exemple (Berkeley's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 1986; Fujisawa et al., Int. Syst. Bact., 42, 487-491, 1992).

Les bactéries lactiques qui sont capables d'adhérer aux cellules intestinales permettent particulièrement de faciliter l'absorption des minéraux. Ces bactéries 15 adhérentes sont d'autant plus intéressantes, dans le cadre de la présente invention, lorsqu'au moins 50 bactéries lactiques, notamment au moins 80 bactéries lactiques sont capables d'adhérer *in-vitro* à 100 cellules intestinale. Pour sélectionner de telles bactéries lactiques adhérentes, il suffit d'étaler une culture de bactéries lactiques sur une culture confluante d'une lignée immortalisée de cellules 20 épithéliales de l'intestin (EP96201064.1), de laver la culture confluante, puis de mesurer le nombre de bactéries adhérentes aux villosités de la lignée, par exemple.

Les bactéries lactiques probiotiques présentent à cet effet un intérêt particulier dans 25 le cadre de la présente invention. Certaines souches sont en fait capables d'adhérer aux cellules intestinales humaines, d'exclure des bactéries pathogènes sur des cellules intestinales humaines, et/ou d'agir sur le système immunitaire humain en lui permettant de réagir plus fortement à des agressions externes (capacité d'immunomodulation), par exemple en augmentant la capacité de phagocytose des 30 granulocytes issus du sang humain (J. of Dairy Science, 78, 491-197, 1995: capacité d'immunomodulation de la souche La-1 qui a été déposée sous le traité de Budapest à la Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM), 25 rue due docteur Roux, 75724 Paris, le 30 juin 1992, où il s'est vu attribuer le numéro de dépôt CNCM I-1225).

35 A titre d'exemple, on peut utiliser la souche probiotique *Lactobacillus acidophilus* CNCM I-1225 décrite dans EP577904. Cette souche a été récemment reclassifiée

parmi les *Lactobacillus johnsonii*, suite à la nouvelle taxonomie, proposée par Fujisawa *et al.*, qui fait maintenant autorité en matière de taxonomie des lactobacilles acidophiles (Int. J. Syst. Bact., 42, 487-791, 1992). D'autres bactéries probiotiques sont également disponibles, comme celles décrites dans EP199535 (Gorbach *et al.*), US5296221 (Mitsuoka *et al.*), US556785 (Institut Pasteur) ou US5591428 (Probi AB), par exemple.

10 Les compositions selon l'invention peuvent être préparées sous la forme de compositions alimentaires destinées à l'alimentation humaine ou animale, ou sous la forme de compositions pharmaceutiques destinées plus particulièrement à être ingérées oralement, naturellement ou au moyen d'une sonde, par exemple sous la forme d'une préparation entérale, d'une gélule, d'un comprimé, d'un sirop ou d'une poudre dispersible dans l'eau.

15 Ces compositions comprennent de préférence une quantité suffisante de bactéries lactiques vivantes pour que l'on puisse observer une absorption facilitée des minéraux par les cellules intestinales, par exemple au moins 10<sup>6</sup> cfu/ml, notamment 10<sup>7</sup>-10<sup>11</sup> cfu/ml ("cfu" provient de l'expression anglaise "colony forming unit").

20 Ces compositions peuvent être fermentées de sorte à obtenir une quantité satisfaisante de bactéries lactiques pour les besoins de la présente invention. Les compositions fermentées à base de lait sont ainsi particulièrement adaptées. Le terme lait s'applique non seulement aux laits d'animaux mais également à ce que l'on appelle communément un lait végétal, c'est à dire un extrait de matières végétales traitées ou non, telles que les légumineuses (soja, pois chiche, lentille, ect...) ou des oléagineuses (colza, soja, sésame, coton, ect...), extrait qui contient des protéines en solution ou en suspension colloïdale, coagulables par action chimique, par fermentation acide et/ou par la chaleur. Ces laits végétaux ont pu subir des traitements thermiques analogues à ceux des laits animaux. Ils ont pu subir également des traitements qui leur sont propres, tels que la décoloration, la désodorisation, et des traitements pour la suppression de goûts indésirables. Enfin, le mot lait désigne aussi des mélanges de laits animaux et de laits végétaux.

On peut aussi ajouter, mélanger ou enrober une composition selon l'invention, au cours de sa préparation, avec une quantité appropriée d'une culture de bactéries lactiques sous forme liquide, concentrée, sèche ou encapsulée, selon les besoins.

5 On a trouvé que la micro-encapsulation des bactéries présente des avantages thérapeutiques indéniables. Premièrement, la micro-encapsulation augmente significativement la survie des bactéries lactiques, et donc le nombre de bactéries lactiques vivantes qui arrivent dans l'intestin. Encore plus important, les bactéries lactiques sont graduellement relâchées dans l'intestin, ce qui permet une action 10 prolongée des bactéries lactiques sur l'absorption des minéraux par les cellules intestinales.

De préférence, pour encapsuler les bactéries lactiques, on sèche les bactéries lactiques par lyophilisation ou par pulvérisation (EP96201922.0), et on les incorpore dans un gel formé, par exemple, par un acide gras solidifié, un alginat 15 de sodium, de l'hydroxypropylmethylcellulose polymérisé ou du polyvinylpyrrolidone polymérisé. A cet effet, l'enseignement dispensé dans FR2443247 (Société des Produits Nestlé) est incorporé par référence à la description de la présente invention).

20 Les compositions ne doivent pas obligatoirement contenir des carbohydrates nécessaires à une fermentation active des bactéries lactiques dans le milieu intestinale. Au contraire, l'absorption facilité des minéraux est indépendante de l'activité fermentaire des bactéries lactiques, mais semble plutôt découler du 25 contact des bactéries lactiques avec les cellules intestinales qui induirait une acidification du micro-environnement et donc une meilleure solubilisation des minéraux.

Néanmoins, il peut être utile d'assurer un renouvellement ou une multiplication 30 spécifique des bactéries lactiques dans le milieu intestinal de sorte à prolonger l'effet d'absorption facilitée des minéraux. Pour cela, on peut adjoindre à la composition des fibres facilitant la multiplication spécifique des bactéries lactiques dans le milieu intestinal.

35 Ces fibres peuvent être de nature protéique ou saccharidique choisies, par exemple, parmi les pectines végétales, les chito-, fructo-, gentio-, galacto-,

isomalto-, manno- ou xylo-oligosaccharides ou les oligosaccharides de soja, par exemple (Playne et al., Bulletin of the IDF 313, Group B42, Annual Session of September 95, Vienna).

5 Les pectines préférées sont des polymères d'acide  $\alpha$ -1,4-D-galacturonique ayant un poids moléculaire de l'ordre de 10 à 400 kDa, que l'on peut purifier des carottes ou des tomates, par exemple (JP60164432). Les galacto-oligosaccharides préférés comprennent une partie saccharidique constituée 2 à 5 unités répétitives de la structure  $[-\alpha\text{-D-Glu-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1\rightarrow6)\text{-}}]$  (Yakult Honsa Co., Japon). Les  
 10 fructo-oligosaccharides préférés sont des inulin-oligofructose extraits de la chicorée pouvant comprendre, par exemple, 1-9 unités répétitives de la structure  $[-\beta\text{-D-Fru-(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Fru-(1\rightarrow2)\text{-}}]$  (WO94/12541; Raffinerie Tirlemontoise S.A., Belgique), ou des oligosaccharides synthétisés à partir d'unités saccharose pouvant comprendre, par exemple, une partie saccharidique constituée de 2 à 9 unités répétitives de la structure  $[-\alpha\text{-D-Glu-(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Fru-(1\rightarrow2)\text{-}}]$  (Meiji Seika Kasiha Co., Japon). Les malto-oligosaccharides préférés comprennent une partie saccharidique constituée de 2 à 7 unités répétitives de la structure  $[-\alpha\text{-D-Gal-(1\rightarrow4)\text{-}}]$  (Nihon Shokuhin Kako Co., Japon). Les isomaltose préférés comprennent une partie saccharidique constituée de 2 à 6 unités répétitives de la structure  $[-\alpha\text{-D-Glu-(1\rightarrow6)\text{-}}]$  (Showa Sangyo Co., Japon). Les gentio-oligosaccharides préférés comprennent une partie saccharidique constituée de 2 à 5 unités répétitives de la structure  $[-\beta\text{-D-Glu-(1\rightarrow6)\text{-}}]$  (Nihon Shokuhin Kako Co., Japon). Enfin, les xylo-oligosaccharides préférés comprennent une partie saccharidique constituée de 2 à 9 unités répétitives de la structure  $[-\beta\text{-xyl-(1\rightarrow4)\text{-}}]$  (Suntory Co., Japon), par exemple.  
 15  
 20  
 25

La quantité de fibres dans la composition dépend de la capacité de celles-ci à promouvoir le développement des bactéries lactiques. En règle général, la composition peut contenir de 1 à 50% de telles fibres (en poids sur la matière sèche), notamment au moins  $10^3$  CFU de bactéries lactiques par g de fibres, de préférence  $10^4$  à  $10^7$  CFU/g de fibres.  
 30

Un autre avantage apporté par les fibres réside dans le fait que le transit intestinal est retardé par les fibres, d'autant plus si la quantité de fibres est importante, c'est à dire de l'ordre de 20-50% par rapport au poids de la composition, par exemple. Les bactéries lactiques étant graduellement éliminées par l'action du transit  
 35

intestinal, on peut par cette manière prolonger l'action bénéfique des bactéries lactiques sur l'absorption des minéraux par l'intestin.

Les compositions selon l'invention peuvent être en définitive tous les produits existants renfermant des bactéries lactiques vivantes, tel qu'un lait fermenté (EP577904), un lait infantile comprenant des bactéries lactiques (EP96202475.8), un fromage frais (EP96203683.6), un fromage affiné, une crème glacée comprenant des bactéries lactiques (voir EP96202479.0), un biscuit fourré par une crème comprenant des bactéries lactiques (EP704164; EP666031), un saucisson et/ou un pâté (voir EP689769), par exemple.

Ces compositions sont particulièrement indiquées pour le traitement ou la prophylaxie des personnes présentant des déficiences en minéraux, voire pour compenser les déficiences physiologiques dues à un régime pauvre en minéraux, voire encore pour satisfaire les besoins physiologiques importants en minéraux des jeunes enfants, des femmes enceintes, des femmes qui allaitent, et des personnes âgées, par exemple.

Les personnes ne supportant pas les produits laitiers (renfermant de grandes quantités de minéraux solubles) peuvent également profiter de l'effet bénéfique de compositions adaptées ne comprenant pas de dérivés laitiers allergiques mais renfermant des bactéries lactiques. Les jeunes enfants et les nourrissons représentent ainsi une population particulièrement sensible au traitement selon l'invention, par exemple au moyen de compositions comprenant des minéraux, une quantité suffisante de bactéries lactiques pour faciliter l'absorption des minéraux (notamment du calcium) par les cellules intestinales, et des dérivés du lait hypo-allergiques conformes à la directive Européenne 96/4/EC (stipule que dans un lait hypo-allergique les protéines allergiques doivent être immunologiquement au minimum 100 fois moins détectables que dans un lait non-hydrolysé: Off. J. Europ. Comm., NoL49/12, annexe point 5.a, 1996; Fritsché et al. Int Arch. Aller and Appl. Imm., 93, 289-293, 1990).

La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui est précédé d'une brève description des figures. Les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire. Il va de soi, toutefois,

que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

### Figures

5

- Figure 1 représente l'absorption basale du calcium par les cellules Caco-2 en absences de bactéries lactiques.
- Figure 2 représente l'influence de La1 et La10 sur l'absorption du calcium par les cellules Caco-2.
- 10 - Figure 3 représente l'influence de différentes souches de *Lactobacillus acidophilus et johnsonii* sur l'absorption du calcium par les Caco-2.

### Exemple 1

15 - Matériel: le  $^{45}\text{CaCl}_2$  provient de chez Amersham, le Lucifer-yellow de Sigma, le collagène I de chez Centrix Pharmaceuticals, le PBS, l'HEPES et les composants du milieu de culture cellulaire de chez Gibco, et les supports de culture de chez Falcon.

20 - Culture cellulaire: la lignée cellulaire humaine Caco-2 isolée d'un adénocarcinome du colon, provient de l'American Type Culture Collection (passage 41). Les cellules sont mises en culture à  $4 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> en flasks de 75 cm<sup>2</sup> dans du DMEM contenant 4.5 g/l de glucose, 20% de serum de veau foetal inactivé par la chaleur, 1 mg/ml de fungizone, 100 U/ml de penicilline/streptomycine, 200 µg/ml de gentamycine et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules sont trypsinées régulièrement et remises en culture à 1:20. Les cellules utilisées dans les expériences de transport du calcium sont mises en culture à  $1 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des inserts perméables préalablement recouverts d'une couche de collagène I à 50 µg/ml. Dans tous les cas, les cellules sont 25 maintenues dans un incubateur 10% CO<sub>2</sub>/90% air à 37°C, et le milieu est renouvelé tous les deux jours.

30 - Viabilité des cellules Caco-2: afin d'exclure la possibilité que la potentialisation de l'absorption du calcium par les cellules intestinales en présence des bactéries lactiques soit due à des dommages cellulaires, une partie de chaque échantillon servant au dosage du calcium a été utilisée pour un dosage de l'activité de la

lactate déshydrogénase (LDH; Cytotoxicity Detection Kit, Boehringer). Ce test colorimétrique permet de quantifier la lyse et/ou la mort cellulaire en mesurant l'activité LDH libérée dans le surnageant à partir du cytosol de cellules endommagées. Les résultats montrent que dans toutes les expériences, l'activité

5 LDH est équivalente, voire inférieure, en présence de bactéries lactiques.

- Perméabilité du tapis cellulaire: l'intégrité du tapis que forment les Caco-2 au terme de leur croissance et de leur différenciation est évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) grâce à un voltmètre/ohmmètre

10 Millicell-ERS. Les expériences d'absorption du calcium sont entreprises lorsque cette résistance atteint au moins 700 ohm x cm<sup>2</sup>. La perméabilité du tapis cellulaire durant les expériences d'absorption du calcium est évaluée en mesurant le taux de diffusion (en %) du Lucifer-yellow, une molécule qui ne traverse pas la membrane cellulaire.

15 - Transport du calcium: les Caco-2 sont cultivées sur inserts pendant 3 à 5 semaines. Le jour de l'expérience, le tapis cellulaire est lavé deux fois en PBS, puis le compartiment inférieur de l'insert figurant la serosa (pôle basolatéral des cellules) reçoit 2.5 ml de tampon de transport (140 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 0.34

20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 4 mM glutamine, 25 mM glucose, pH7.4) additionné de 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, alors que le compartiment supérieur de l'insert figurant la lumière intestinale (pôle apical des cellules) reçoit 1.5 ml de tampon de transport additionné de 10 mM de CaCl<sub>2</sub> et de quantités traces de <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> et du Lucifer-yellow. Les inserts sont alors placés à

25 37°C et 50 µl d'échantillon des compartiments inférieur et supérieur sont prélevés à intervalles réguliers.

30 La radioactivité contenue dans ces échantillons est évaluée par comptage en liquide de scintillation et permet d'extrapoler sur la quantité de CaCl<sub>2</sub> froid absorbé. Le transport basal du calcium est exprimé en nmoles de calcium transportées vers le compartiment inférieur de l'insert. La diffusion du Lucifer-yellow détectée par spectrofluorométrie dans le compartiment inférieur est exprimée en % de la quantité introduite dans le compartiment supérieur.

35 - Influence des bactéries lactiques: *Lactobacillus johnsonii* La1 (CNCM I-1225), La17, La22, *Lactobacillus acidophilus* La10, La18, La29, La31, *Lactobacillus*

*bulgaricus* Lfi5, YL8, et *Streptococcus thermophilus* Sfi20, YS4 (Nestec collection, Lausanne, Suisse) sont mis en culture en anaérobiose dans du MRS-broth pour les *Lactobacillus* ou du M17 pour les *Streptococcus* pour 2 fois 24 h, lavés en PBS et resuspendus dans du tampon de transport avant d'être introduits dans le compartiment supérieur des inserts. Le rapport Caco-2:bactéries est alors d'environ 1:100. L'absorption du calcium est évaluée suivant le protocole mentionné ci-dessus.

- Résultats du transport basal du calcium: un gradient de calcium a été établi dans les inserts en introduisant 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub> dans le compartiment inférieur, ce qui correspond à la concentration plasmatique normale humaine, et arbitrairement 10 mM de CaCl<sub>2</sub> dans le compartiment supérieur, ce qui pourrait correspondre à la teneur en calcium d'une diète alimentaire. Comme le montrent les résultats d'une expérience représentative illustrée par la figure 1, l'absorption basale du calcium par les Caco-2 augmente avec le temps pour atteindre jusqu'à 600 nmoles/insert, comprenant environ  $3 \times 10^6$  cellules, après 4 h. Comme contrôle de l'intégrité du tapis cellulaire durant l'expérience, la diffusion du Lucifer-yellow a été mesurée et s'est révélée inférieure à 2%.

- Mesure de l'influence des bactéries lactiques: l'absorption du calcium par les Caco-2 est augmentée de manière significative (valeur statistique  $p=2 \times 10^{-6}$  sur 9 essais) en présence de la souche *Lactobacillus johnsonii* adhérente La1, mais pas en présence d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* non-adhérente La10 (Figure 2).

D'autres expériences indiquent que d'autres souches de *Lactobacillus johnsonii* adhérents telles que La17 et La22, sont capables d'augmenter l'absorption du calcium, alors qu'une autre souche moyennement adhérente, La31, ne l'augmente pas autant. Toutefois, des souches de *Lactobacillus acidophilus* non-adhérents telles que La18 et La29, sont aussi capables d'augmenter l'absorption du calcium (Fig. 3). La capacité des bactéries à adhérer aux cellules intestinales ne semblent donc pas corrélée à leur capacité à augmenter l'absorption du calcium par ces mêmes cellules.

Dans toutes ces expériences, la diffusion du Lucifer-yellow est modulée de façon similaire mais reste négligeable.

On observe également une diminution du pH dans le compartiment supérieur des inserts lorsque les Caco-2 sont en présence de bactéries lactiques, quelle que soit la souche, excepté avec la souche Sfi20 (Table 1). Il n'existe donc pas de corrélation entre l'augmentation de l'absorption du calcium et cette diminution du pH. Il faut toutefois souligner que certaines souches bactériennes capables d'augmenter l'absorption du calcium ne sont pas capables d'acidifier le milieu expérimental en absence de Caco-2. Ceci signifie que l'acidification en présence de Caco-2 et de bactéries nécessite une collaboration entre les deux types d'organismes et pourrait être le fait des cellules Caco-2.

10

Table 1: Influence des bactéries lactiques sur le pH du milieu expérimental en absence ou en présence de cellules Caco-2

Bacteria	Nombre d'essai(s)	pH sans Caco-2	pH avec Caco-2
None	4	7 +/- 0	7 +/- 0
La1	3	6.75 +/- 0.3	3.75 +/- 0.3
La10	3	4.65 +/- 0.3	4.15 +/- 0.3
La17	2	7 +/- 0	3.5 +/- 0.7
La18	2	7 +/- 0	3.5 +/- 0.5
La22	2	7 +/- 0	3.25 +/- 0.35
La29	2	4.25 +/- 0.35	3.5 +/- 0
La31	2	7 +/- 0	3.75 +/- 0.35
Sfi20	1	7	7
YS4	1	5	4
Lfi5	1	4	3
YL8	1	4	3

15

### Exemple 2

Des essais similaires à ceux réalisés à l'exemple 1 ont été réalisés pour déterminer l'influence des bactéries lactiques sur l'absorption du calcium par les cellules intestinales en présence d'inuline marquée ( $^{3}\text{H}$ -inuline, Amersham; fibre prébiotique traceur). Les résultats confirment que les bactéries lactiques augmentent *in-vitro* l'absorption des minéraux par les cellules intestinales.

### Exemple 3

25 Des essais similaires à ceux réalisés à l'exemple 1 ont été réalisés pour déterminer l'influence des bactéries lactiques sur l'absorption du magnésium, du fer et du zinc

par les cellules intestinales. Les résultats confirment que les bactéries lactiques augmentent *in-vitro* l'absorption des minéraux par les cellules intestinales.

#### Exemple 4 Encapsulation de bactéries lactiques

5

Dans une cuve de 100 l, on prépare 80 l de milieu de culture présentant la composition suivante, en %:

Extrait de levure	0.25%
Trypticase	1.00%
Phytone	0.50%
Glucose	1.50%
L-cysteine HCl	0.05%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25%
ZnSO <sub>4</sub>	0.025%
FeC <sub>13</sub>	Trace
Eau	Balance à 100 %

10 On inocule avec 1 l d'une culture de 20 h de *Bifidobacterium longum* CNCM-1228, qui a été déposée sous le traité de Budapest à la Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM), 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris, France, le 30 juin 1992, et qui s'est vu attribué le numéro de dépôt CNCM I-1228. On incube le milieu pendant 12 h à 30°C. On centrifuge le bouillon de culture et 15 l'on récolte 240 g de cellules. On les dilue dans 250 ml de lait écrémé additionné de 7% de lactose. On congèle le mélange à l'azote liquide. On lyophilise à 40°C pendant une nuit. On prépare une dispersion à 5% de la poudre obtenue dans de la graisse végétale hydrogénée présentant un point de fusion de 42° et liquéfiée à 45°C. On injecte la dispersion à 45°C sous une pression de 4 bars, en même temps 20 que de l'azote liquide, à raison de 1 partie de dispersion pour 5 parties d'azote, au sommet d'un cylindre vertical de 1,5m de diamètre et 10 m de hauteur. Au fond du cylindre est placé un récipient contenant de l'azote liquide dans lequel on recueille des microbilles renfermant des bifidobactéries dont le diamètre oscille entre 0,1 et 0,5 m. On met ensuite les microbilles en lit fluidifié et l'on pulvérise sur le lit une 25 solution alcoolique à 8% de zéine, en quantité telle que la couche de zéine formée autour des microbilles représente 5% de leur poids.

Les microbilles sont ensuite incorporées à une composition alimentaire destinée à faciliter l'absorption des minéraux par les cellules intestinales.

Revendications

1. Utilisation des bactéries lactiques pour la préparation d'une composition destinée à être administrée oralement à un mammifère de sorte à faciliter 5 l'absorption par les cellules intestinales des minéraux présents dans une diète journalière.
2. Utilisation selon la revendication 1, pour faciliter l'absorption des composés renfermant du calcium, du magnésium, du fer et/ou du zinc.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 1, d'une quantité suffisante de bactéries lactiques vivantes pour que l'on puisse observer une absorption facilitée des minéraux par les cellules intestinales.
- 15 4. Utilisation selon la revendication 1, de bactéries lactiques capables d'adhérer aux cellules intestinales.
5. Utilisation selon la revendication 3, de bactéries lactiques probiotiques, notamment la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225.
- 20 6. Utilisation selon la revendication 1, pour la préparation d'une composition alimentaire ou pharmaceutique.
- 25 7. Utilisation selon la revendication 6, pour la préparation d'une composition laitière infantile ne comprenant pas de dérivés laitiers allergéniques.
8. Utilisation selon la revendication 1, pour la préparation d'une composition renfermant en outre des fibres facilitant la multiplication spécifique des bactéries lactiques dans le milieu intestinal.
- 30 9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-8, pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la prophylaxis des personnes présentant des déficiences en minéraux, ou à compenser les déficiences physiologiques dues à un régime pauvre en minéraux, ou à satisfaire les besoins physiologiques importants en minéraux des jeunes enfants, des femmes enceintes, 35 des femmes qui allaitent, et des personnes âgées.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisée en ce que les bactéries lactiques sont encapsulées.

## Absorption des minéraux

### Résumé

5 Utilisation des bactéries lactiques pour la préparation d'une composition destinée à être administrée oralement à un mammifère de sorte à faciliter l'absorption par les cellules intestinales des minéraux présents dans une diète journalière. Les compositions sont particulièrement indiquées pour le traitement ou la prophylaxie des personnes présentant des déficiences en minéraux, ou pour compenser les 10 déficiences physiologiques dues à un régime pauvre en minéraux, ou pour satisfaire les besoins physiologiques importants en minéraux des jeunes enfants, des femmes enceintes, des femmes qui allaitent, et des personnes âgées.

Fig. 2

15

Figure 1

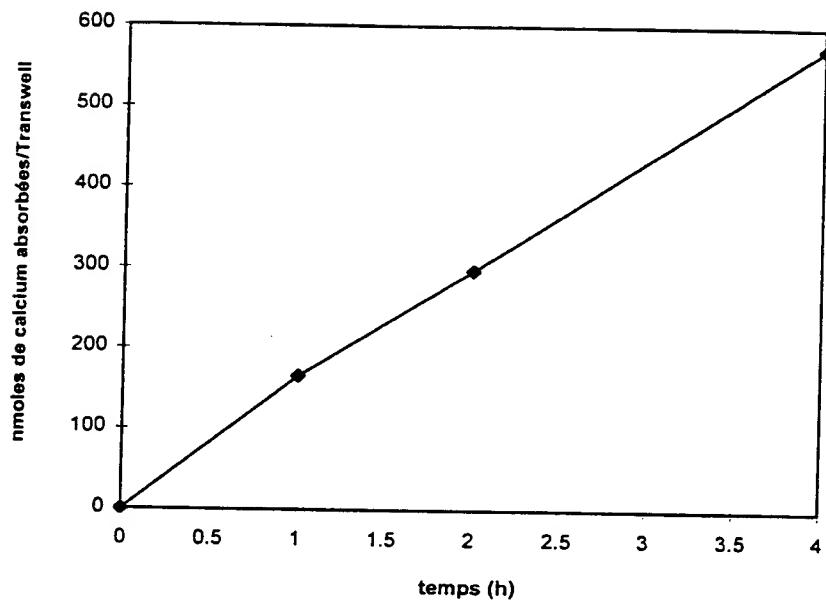


Figure 2

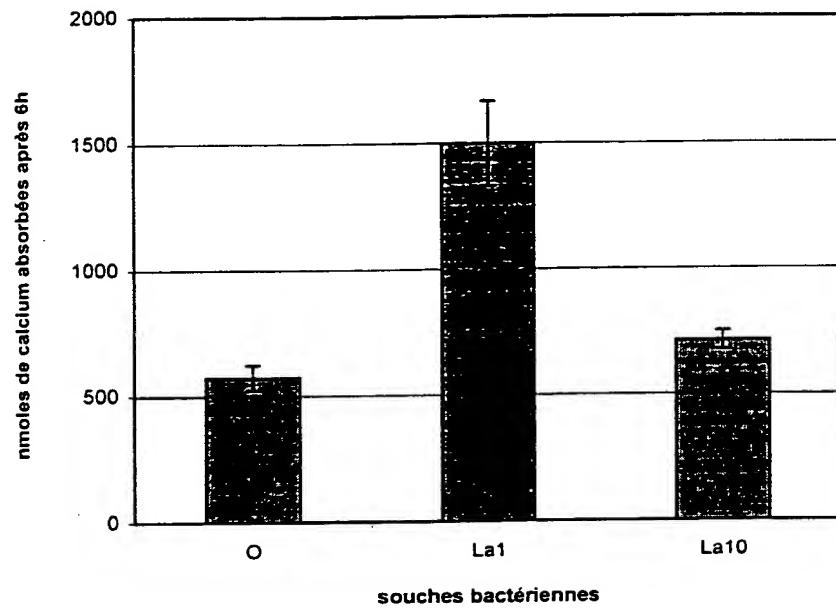


Figure 3

